

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 09-224676

(43)Date of publication of application : 02.09.1997

(51)Int.Cl.

C12N 15/09
 C07H 21/04
 C12N 1/19
 // C12N 9/04
 C12N 9/10
 C12N 9/26
 (C12N 1/19
 C12R 1:865)
 (C12N 9/04
 C12R 1:865)
 (C12N 9/10
 C12R 1:865)
 (C12N 9/26
 C12R 1:865)

(21)Application number : 08-039821

(71)Applicant : KIRIN BREWERY CO LTD

(22)Date of filing : 27.02.1996

(72)Inventor : KOBAYASHI OSAMU
 SONE HIDETAKA

(54) NEW PROMOTER

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new promoter originated from a specific beer yeast, having a specific DNA sequence or its homologous sequence retaining the activity, exhibiting a high promoter activity and capable of being utilized in a different kind gene-expressing system using a yeast as a host.

SOLUTION: This promoter comprises a DNA fragment having a DNA sequence of the formula having a promoter activity or a sequence homologous to the DNA sequence and retaining the promoter activity. The DNA fragment has a high promoter activity, can be utilized in a different kind gene-expressing system using a yeast as a host, and is useful for producing proteins such as α -acetolactic acid decarboxylase, alcohol acetyltransferase and glucoamylase. The DNA sequence is obtained by cloning a bottom beer yeast (*Saccharomyces cerevisiae* Lg-FLO 1) gene from the chromosome of the bottom beer yeast, and subsequently collecting the DNA fragment containing the highly active promoter from the cloned product. The DNA fragment containing the highly active promoter is found out by examining the gene-expressing property of the cloned product.

ABSTRACT OF THE PATENT APPLICATION FOR THE INVENTION OF A NEW PROMOTER
 THE INVENTION OF A NEW PROMOTER IS DESCRIBED IN THE ATTACHED DOCUMENTS
 THE INVENTION OF A NEW PROMOTER IS DESCRIBED IN THE ATTACHED DOCUMENTS
 THE INVENTION OF A NEW PROMOTER IS DESCRIBED IN THE ATTACHED DOCUMENTS

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or

<http://www1.ipdl.jpo.go.jp/PA1/result/detail/main/wAAAa12863DA409224676P1.htm> 2002/03/26

Searching PAJ

application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japan Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-224676

(43)公開日 平成9年(1997)9月2日

(51)Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/09	Z N A	9282-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 N 1/19			C 1 2 N 1/19	
// C 1 2 N 9/04			C 1 2 N 9/04	F
9/10			9/10	

審査請求 未請求 請求項の数6 O L (全 8 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平8-39821

(22)出願日 平成8年(1996)2月27日

(71)出願人 000253503

麒麟麦酒株式会社

東京都中央区新川二丁目10番1号

(72)発明者 小林 統

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟

麦酒株式会社基盤技術研究所内

(72)発明者 曾根 秀隆

神奈川県横浜市金沢区福浦1-13-5 麒麟

麦酒株式会社基盤技術研究所内

(74)代理人 弁理士 平木 祐輔 (外1名)

(54)【発明の名称】 新規プロモーター

(57)【要約】

【目的】 プロモーター活性を有するDNA断片の提供。

【解決手段】 以下の配列を有するDNA配列、または以下の配列と相同性を有しかつプロモーター活性を保持する配列を有する、DNA断片。

```
AATTTTCATG GGAGATACGT TAAATCTTTC ACAGTCTTAT CAAATTTTCA TGGGAGATAC 60
GTAAATCTT TCACAGTCTT ATCGTTTGA ATCACTGGAC GGTCTGGTA TTCTGCTTCA 120
TATTCGACA AAATAATAAA TATAAAAAGA GCACCCTCAT GATTTCTTGC TCTGCAGTAA 180
ATTCCGCAAA TGATTTTCTT TAAATTGATT AGCACCACTA AAAAAA 226
```

【効果】 本発明によれば、酵母を宿主とする異種遺伝子発現系において利用できる、高活性なプロモーターが

提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1に記載されるDNA配列、またはプロモーター活性を保持するその相同配列を有するDNA配列。

【請求項2】 配列番号2に記載されるDNA配列、またはプロモーター活性を保持するその相同配列を有するDNA配列。

【請求項3】 請求項1または2に記載のDNA配列と、その下流に位置する外来遺伝子とを含んでなる発現プラスミド。

【請求項4】 請求項3に記載の発現プラスミドによる形質転換により取得された形質転換体。

【請求項5】 宿主が酵母である請求項4に記載の形質転換体。

【請求項6】 請求項4または5に記載の形質転換体を培養し、培養物から蛋白質を得ることを特徴とする蛋白質の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は新規なプロモーターに関する。適当なベクターに挿入された本発明のプロモーターは、宿主で外来遺伝子の発現に使用される。

【0002】

【従来の技術】 近年、遺伝子工学の技術を酵母に応用することにより、目的とする蛋白質を大量に製造する酵母株の造成が試みられている。この試みにおいては、目的とする蛋白質それ自体が有用である場合もあり、また目的とする蛋白質が製造されて酵母の性質が改良され、その酵母の有用性が高められることもある。後者の可能性のある具体例としては、酵母を利用したアルコール製造、アミノ酸製造などの代謝産物の製造のほか、発酵食物（例えば、パン、味噌、醤油）もしくは発酵飲料（例えば、ビール、ワイン、清酒、焼酎、スピリット類）の製造への応用がある。

【0003】 今日まで、遺伝子工学の技術を用いて目的とする蛋白質を酵母中で大量に発現させることを目的として、「プロモーター」の開発が精力的に行われてきた。現在までいくつかの強力なプロモーターが見い出されており、酵母中での外来遺伝子の発現に有用であることが示されている。例えば、サッカロミセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) の遺伝子ADC1（別名ADH）、GAPDH（別名GPD）、PGK遺伝子などのプロモーターが、酵母での異種遺伝子の発現に使用されている。

【0004】 一方、遺伝子工学の進歩に伴い、複数種類の外来遺伝子を同時に同一宿主内で発現することによる菌株改良が行われるようになった。この複数種類の外来遺伝子の発現を実現するには、それと同数の種類のプロモーターを用いることが、遺伝子工学による菌株改良操作、および目的とする改良株の遺伝的安定性などの点か

ら好ましい。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、酵母を宿主とする異種遺伝子発現系において利用できる、高活性なプロモーターを提供することを目的とする。

【0006】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、上記課題を解決すべく、下面ビール酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) のLg-FLO1遺伝子の遺伝子発現について鋭意検討をした結果、下面ビール酵母染色体から高活性なプロモーターを含むDNA断片を取得することに成功し、本発明を完成するに至った。

【0007】 すなわち、本発明は、配列番号1に記載されるDNA配列、またはプロモーター活性を保持するその相同配列を有するDNA配列、または配列番号2に記載されるDNA配列、またはプロモーター活性を保持するその相同配列を有するDNA配列である。本発明はまた、前記DNA配列と、その下流に位置する外来遺伝子とを含んでなる発現プラスミドである。さらに、本発明は、前記発現プラスミドによる形質転換により取得された形質転換体である。さらにまた、本発明は、前記形質転換体を培養し、培養物から蛋白質を得ることを特徴とする蛋白質の製造法である。法である。

【0008】 本発明によるDNA断片は高いプロモーター活性を有するプロモーターを含んでいる。従って、本発明によるDNA断片を外来遺伝子とともに連結したプラスミドを宿主に導入することによって、外来遺伝子を高発現させることができる。

【0009】

【発明の実施の形態】

(1) プロモーター活性を有するDNA断片

本発明のプロモーター活性を有するDNA断片は配列番号1で表される。このDNA断片は酵母においてLg-FLO1蛋白質の構造遺伝子の下流に位置し、プロモーター領域を含むものである。さらに、本発明によるプロモーター活性を有するDNA断片には、配列番号1で表される配列に加えて、配列番号1に記載されるDNA配列と相同性を有し、かつプロモーター活性を保持する配列も含まれる。このような配列には、配列番号1の配列およびその部分配列中の塩基のいずれかについて欠失、置換、および付加、並びにこれらの組み合わせが存在するが、そのプロモーター活性を保持する配列も包含される意味に解釈されるべきである。図3に示したように、配列番号1で表される226bpの配列ではプロモーター活性を持っているが、配列番号1で表される配列の3'側の175bpではプロモーター活性をほとんど持たない。これより、充分なプロモーター活性を持つDNA断片の長さは、226bp以下、かつ176bp以上であると推察される。また、配列番号2で表される1779bp配列は、配列番号1で表される配列を含んでい

るが、図3に示したように、配列番号2で表されるDNA配列は、配列番号1に示されたDNA配列よりも高いプロモーター活性を持つ。

【0010】なお、本発明において「プロモーター」とは、宿主細胞中で構造遺伝子に連結したとき、その構造遺伝子に関して、そのプロモーターが存在しない条件下の転写、翻訳、もしくは、mRNAの安定性を増大させる任意のDNA配列を意味する。また、「外来遺伝子」とは、その遺伝子が特定生物に由来するか否かを問わず、自然界では特定のプロモーターと機能的に共存していない任意の遺伝子を意味する。さらに、本発明では、「DNA」、「遺伝子」、および「遺伝子DNA」という用語を実質的に同義のものとして用いることとする。

【0011】本発明の上記酵母プロモーターを含むDNA断片は慣用されている核酸合成の手法により全合成することができる。

【0012】(2) 形質転換および外来遺伝子の発現等本発明によるプロモーターを含むDNA断片をその上流に連結した外来遺伝子（以下「プロモーター連結外来遺伝子」ということがある）を酵母に導入することにより、外来遺伝子の発現が本発明によるプロモーターによって制御されている酵母を取得することができる。

【0013】このプロモーター連結外来遺伝子を酵母に導入する方法としては、Methods in Enzymology, Volume 194 (1991) に記載されているように当業界において慣用されている手法を用いることができる。具体的には、プロモーター連結外来遺伝子をベクターに組み込んでこれを酵母に導入する方法、直接酵母に導入する方法等が挙げられる。

【0014】本発明によれば、プロモーター遺伝子を含むDNA断片と、その下流に位置する外来遺伝子とを連結してなるDNA断片を含むDNAがベクターに連結された発現プラスミドが提供される。

【0015】発現プラスミド構築のために用いられるベクターとしては、例えばYRp系（酵母染色体のARS配列を複製起点とする酵母用マルチコピーベクター）、YEp系（酵母の2μm DNAの複製起点を持つマルチコピーベクター）、YCp系（酵母染色体のARS配列を複製起点として持ち、かつ酵母染色体のセントロメアのDNA配列を持つ酵母用シングルコピーベクター）、YIp系（酵母の複製起点を持たない酵母染色体組み込み用ベクター）などの酵母用ベクターとして用いられているものを挙げることができる。これらのベクターおよびその組み換え体の作製等については、Methods in Enzymology, Volume 194 (1991) に記載されている。

【0016】連結される外来遺伝子は特に限定されるものではないが、例えば、α-アセト乳酸脱炭酸酵素遺伝子、アルコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子、グルコアミラーゼ遺伝子などを用いることができる。連結される外来遺伝子はそれにコードされている遺伝子産物

の発現を目的とすること限定されず、アンチセンスRNAによる発現制御もその目的に含まれる。

【0017】発現プラスミドには、形質転換体選択のためのマーカー遺伝子（例えばG418耐性遺伝子、セルレニン耐性遺伝子、銅耐性遺伝子）、形質転換する宿主の種類に応じたターミネーター（例えばPGK遺伝子、ADC遺伝子、GPD遺伝子のターミネーター）などを連結することができる。

【0018】発現プラスミドによる形質転換法としては、例えば、リチウムアセテート法が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0019】また、酵母に直接DNAを導入する手法としては、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子を持つプラスミドと導入する遺伝子DNAとで同時に酵母を形質転換する共形質転換法（特公平5-60918号）を挙げることができる。

【0020】発現ベクターによって形質転換される宿主としては、好ましくは酵母が挙げられる。具体的には実験酵母、ビール酵母、ワイン酵母、清酒酵母、ウイスキー酵母、焼酎酵母などの醸造用酵母のほか、パン酵母などの食品用酵母、アルコール生産用酵母などの工業用酵母などを用いることができる。

【0021】また、本発明による形質転換体を培養することによって、蛋白質を製造することができる。発現することができる蛋白質としては、例えばビール酵母においては、α-アセト乳酸脱炭酸酵素、アルコールアセチルトランスフェラーゼ、グルコアミラーゼなどである。

【0022】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【実施例1】 醸造用酵母のLg-FL01遺伝子の発現様式の調査

Lg-FL01遺伝子を持つ醸造用酵母、KBY001を、YM15培地[1.25%酵母抽出物（ディフコ社）、1.25%麦芽抽出物（ディフコ社）、15%ブドウ糖（和光純薬）]で30℃で振とう培養し、静止期に達した細胞を、OD600=0.15となるようにYM15培地に植菌し、20℃で振とう条件下で培養し、12時間ごとにサンプリングを行った。その際に、培地中の細胞のOD600の値も測定した。得られた試料から、ElitonとWarnerの方法（Cell, 39, 663-673, 1984）で全RNAを抽出し、その0.01mgを0.016mlのDMSO溶液（1Mグリオキサール、50%DMSO、10mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH7.0）で1時間、50℃の処理によってグリオキサール化を行った後、0.002mlのアプライ用緩衝液[50%（W/V）グリセロール、10mMリン酸緩衝液（pH7.0）、0.4%（W/V）ブロムフェニルブルー]および0.01mlの臭化エチジウム溶液（1mg/ml）を加え、10mMリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）、1%アガロースを含むゲル中で電気泳動を行った。電気泳動中は、ペリスタポンプを用いて、電気泳動槽中の緩衝液を常に循環さ

せ、pHの勾配が生ずることを防いだ。ブロムフェニルブルーがゲルの長さの70%程度に達したときに電気泳動を中止し、紫外線トランスイルミネーターを用いて臭化エチジウムで染色されたゲル中のRNAを観察し、リボソーマルRNAを指標にRNAが分解されていないことを確認した。その後、ゲル中のRNAを、その添付されたプロトコールに従って、ナイロンフィルターGenescreen-Plus (デュポン社) にブロットイングし、RNAがブロットイングされたフィルターに対し、80℃、2時間の処理を行った。このフィルターは、Genescreen-Plusに添付されたプロトコールに従ってノーザン解析に供試した。プローブとしては、5' GATGAACTGTCATTGTTGCAAA3' と5' TCGT TTCAGCAGCTAAAGTAT3' の2種のプライマーと、酵母ABXL-1D (Yeast Genetic Stock Center) からHerefordら (Cell, 18, 1261-1271, 1979) の方法で抽出したDNAを用いて、PCRで増幅した1045bpのFL01遺伝子の部分長を用いた。プローブは [α -32P]dCTP (アマシャム社) で標識して用いた。放射能の測定は、バイオ・イメージングアナライザーBAS2000 (富士写真フイルム) を用いて行った。結果を図1に示す。酵母細胞が対数増殖の中期～後期にあるときに、Lg-FL01遺伝子の転写産物量はピークに達し、その後酵母細胞が静止期に入ると、この遺伝子の転写産物量は微減してゆくことが示された。

【0023】〔実施例2〕 Lg-FL01遺伝子のプロモーター領域のDNA塩基配列の決定

Lg-FL01遺伝子のクローニングは、European Brewery Convention第25回大会 (1995年、ブリュッセル) 講演要旨集361～368ページに記載した通りに行った。得られた全長のLg-FL01遺伝子から、翻訳開始点と推定される点より上流1779bpの断片をLg-FL01遺伝子のプロモーター領域とし、この断片をPCRで増幅し、pT7-BlueT-Vector (宝酒造) にクローニングした。得られたプラスミドの挿入断片について、キローセケンス用デレーションキット (宝酒造) を用いて添付プロトコールに従って段階的欠失シリーズを作製し、DNA塩基配列を決定した。DNA塩基配列の決定は、PCR/シーケンシングキット (パーキン・エルマー社) を用い、DNAシーケンサ (パーキン・エルマー社) によって行った。結果として得られたDNA塩基配列を、配列表の配列番号2に示す。

【0024】〔実施例3〕 Lg-FL01遺伝子のプロモーターの最小必要領域の決定

lacZ遺伝子発現用プラスミドを図2のように構築した。プラスミドpMC1871 (ファルマシア社) より、 β -ガラクトシダーゼをコードするlacZ遺伝子を3.1kbのBamHI断片として切り出した。この断片をプラスミドYEpl3K (Soneら, Appl. Environ. Microbiol., 54, 38-42, 1988) のBglIII部位に連結し、遺伝子の5'側にHindIII部位のあるpZ4を作製した。次にpZ4のHindIII部位をクレノーフラグメント (宝酒造) で平滑化後、BamHIリンカーを挿入し、さらにSalI部位をクレノーフラグメントで平滑化

後、HindIIIリンカーを挿入した。得られたプラスミドより、5'側にHindIII部位とBamHI部位をこの順で持ち、3'側にYEpl3K由来のFLP遺伝子のターミネーターを持ち、lacZ遺伝子を含む、HindIII～XbaI断片を切り出した。一方、プラスミドpYT37 (Kobayashiら, European Brewery Convention第25回大会講演要旨集、361-368, 1995、ブリュッセル) のNruI部位にXbaIリンカーを挿入し、得られたプラスミドのHindIII～XbaI部位に、前述のHindIII～XbaI断片を挿入し、pYT-lacZと命名した。

【0025】上述のLg-FL01遺伝子のプロモーター領域の内、翻訳開始点と推定される点より上流1779bp、786bp、654bp、570bp、474bp、363bp、328bp、226bp、175bpの断片を、5'側にHindIII部位、3'側にBamHI部位を付与した形でPCRで増幅した。得られたPCR産物を、HindIIIおよびBamHIで消化後、pYT-lacZのHindIII～BamHI部位に挿入した。この中で、1779bpの断片を含むプラスミドを、LgF1Zと命名した。

【0026】これらのプラスミドを、酵母KY644株 (Kobayashiら, European Brewery Convention第25回大会講演要旨集、361-368, 1995、ブリュッセル) に、導入した。得られた形質転換体は、0.125mlのSD培地 (0.67% Yeast Nitrogen Base (アミノ酸抜き、ディフコ社)、0.06%アミノ酸ミックス (ウラシル、ロイシン抜き)、5%ブドウ糖) で24時間、30℃で振とう培養後、5mlのSD培地を加え、さらに72時間、20℃で振とう培養を行った。培養後の細胞は、遠心分離によって集菌し、Methods in Yeast Genetics - A Laboratory Course Manual (Roseら著, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1990) に従って、 β -ガラクトシダーゼ活性の測定を行った。その結果を図3に示す。1779bp～328bpの間では、 β -ガラクトシダーゼ活性の差異はほとんど見られなかったのに対し、226bpのプロモーターでは、328bpのものの半分以下の活性しかなく、175bpのプロモーターでは、プロモーターを全く含まないpYT-lacZを導入した形質転換体と同様、活性はほとんど見られなかった。以上より、Lg-FL01プロモーターは、176bp～226bpのDNA断片が最低必要であると考えられた。さらに高発現させるためには、少なくとも226bp～328bpのDNA断片が必要であると推定された。

【0027】〔実施例4〕 醸造酵母中でのLg-FL01プロモーターによる異種タンパクの発現

G418抵抗性遺伝子発現カセットを含むプラスミドpYT71 (Kobayashiら, European Brewery Convention第25回大会講演要旨集、361-368, 1995、ブリュッセル) のNruI部位に、XbaIリンカーを挿入し、得られたプラスミドのHindIII～XbaI部位に、上述のプラスミドLgF1Z由来のHindIII～XbaI断片 (1779bpのLg-FL01遺伝子のプロモーター、lacZ遺伝子、FLP遺伝子のターミネーターからなるカセットを含む) をクローニングした。得られたプラスミドLgF1ZNE0を、特開平6-62849号中に記載されている

方法にしたがって、醸造用酵母KBY001株に導入した。得られた形質転換体を、0.05mg/mlのG418 (BRL社)を含むYPD培地で1昼夜培養後、最終的にOD600=0.15となるように0.05mg/mlのG418を含む200mlのYPD培地に植菌し、20℃で振とう培養を行った。培養開始後12時間ごとに72時間目まで5mlずつのサンプリングを行い、遠心分離による集菌後、Methods in Yeast Genetics - A Laboratory Course Manual (Roseら著、Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1990)に従って、 β -ガラクトシダーゼ活性の測定を行った。その結果を図4に示す。Lg-FL01遺伝子のプロモーターに制御された β -ガラクトシダーゼの発現は、酵母細胞が対数増殖の中期～後期にあるときにピークに達し、その後酵母細胞が静止期に入ると、 β -ガラクトシダーゼの発現は減少することが示された。すなわち、実施例1で示したLg-FL01遺伝子の転写産物量の経時変化と、概ね同様の傾向を示した。

【0028】〔実施例5〕 Lg-FL01とグリセルアルデヒド-3-デヒドロゲナーゼ遺伝子のプロモーター活性の比較

グリセルアルデヒド-3-デヒドロゲナーゼ (GPD) 遺伝子のプロモーター領域を含む約1.0kbの断片を、5'側にHindIII部位、3'側にBamHI部位を付与した形でPCRで増幅した。得られたPCR産物を、HindIIIおよびBamHIで消化後、pYT-lacZのHindIII～BamHI部位に挿入し、得られたプラスミドをGPDZYCpと命名した。LgFIZおよびGPDZYCpを、リチウム法によって酵母KY644に導入した。得られた形質転換体を、1昼夜、30℃でSD培地によって振とう培養した後、最終密度OD600=0.15となるように20mlの

配列

```
AATTTTCATG GGAGATACGT TAAATCTTTC ACAGTCTTAT CAAATTTTCA TGGGAGATAC 60
GTAAATCTT TCACAGTCTT ATCGTTTTGA ATCACTGGAC GGTCTGGTA TTCTGCTTCA 120
TATTTTCGACA AAATAATAAA TATAAAAAGA GCACCCTCAT GATTCTTGC TCTGCAGTAA 180
ATTCCGCAAA TGATTTTCTT TAAATTGATT AGCACCACTA AAAAAA 226
```

【0030】配列番号：2

配列の長さ：1779

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

配列

```
GAATATCAAA TGCTGTTGTT TTCAACTAAA TCAGACAAGC AAAGGCGATT GCTAAAAGTG 60
AACATATGGA AAATATATGG AAAAAATCTA GAGGCAACAA ACGTTCGGGT TTCCTTTTAA 120
CTCCGAGAAA GAAAAATCAT TAGAAGTTCG TGTAAATCCT AATAGAGTTC AAATATGCTA 180
CTAGCCGTCA GAAACCTCAG TTACATGATT GCACATTCTA AGACTTCACA AGTGAAAAAT 240
TTCCCGACGT TCATAGCATG TTACGTGATC GCGCAGGATG GGACAATTAA ACGATCTTTG 300
CAGTGGAGAA GGAATAACTT CCGGTTGCGC TACTTGTCA AACAGAACAC TGATATGGAT 360
AAGATAATAG TTAGATCTTT TATTACTTAT GAAACAATGT CAGTAACACA GCGTGTTTAA 420
CAGATAATGT TCTTTTAACA AAATTAATATG AGGTCTTTTA TTGTGTGTGT CAAGTTGACA 480
AGCCGCCTTT ATTGATAGAT CCCCATAAAA AATACCAGGA AATGATGAGC TCGAGTCTTT 540
GTGCCTTTCT CATCATGGAC CATTTCGCACA TGCAGTGCTG CACAACAAAA GATAAATCAC 600
```

SD培地に植菌し、20℃で振とう培養した。培養開始後、12時間ごとに5mlずつサンプリングを行い、遠心分離によって集菌した。これらのサンプルから、Methods in Yeast Genetics - A Laboratory Course Manual (Roseら著、Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1990)に従って、 β -ガラクトシダーゼ活性の測定を行った。その結果を図5に示す。Lg-FL01プロモーターに制御された β -ガラクトシダーゼ活性は、対数増殖の中期である36時間目にピークに達し、その後減少したのに対し、GPD遺伝子のプロモーターに制御された β -ガラクトシダーゼ活性は、12時間目より60時間目まで緩やかに上昇を続けた。両遺伝子のプロモーターに制御された β -ガラクトシダーゼ活性の最大値は、ほぼ同等か、Lg-FL01プロモーターに制御されたものの方がやや高かった。

【0029】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：226

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：Genomic DNA

起源：

生物名：サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)

配列の特徴

Lg-FL01遺伝子のプロモーター領域

起源：

生物名：サッカロマイセス セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)

配列の特徴

Lg-FL01遺伝子のプロモーター領域

CAGTATTAGG TGACTTTCAA AACACTAGAA TTTAGGCACT TTCAACCCAG CCCAGCGCGT 660
 AGTAAGAATA AAGTAGGGGA AAACCTTACG AAAAGCCTCT TTCTTTTTTG TAAAAAATTC 720
 TGTTTTAAAT AGCCAGTTCT TTAGTGATTA CAGGTAAGGG GGTTCATAT TTTAGAACTG 780
 CAGCCATGAT GAAGCACTTT TGCTCATTTA TTGCGAGAAG TTTAATAAGT AGTATGGTTC 840
 CATTTTCAAG AATCGAGGCA CTGTTCCCTC CCAACCTTGG AATCATACTC CGAAAGGATT 900
 TCAAGCCGAT TTAAATTCAC CTGGTAACTT TCCTACGGTT TGGCCCAAGG TGATTATAAT 960
 TAACTTGCGG CTTGTTTTCA GCCTGCGATC GAACCTTTTT TACGCAAAAA AACCTTATTA 1020
 ATTAAGGTTT TGAAAATTTT CTCTTTCCG GGAGATTTTC ATGTAGCCTC GAGCTTCTGG 1080
 ATTCTCACGG GATTATCTCG CGTTACATTT TTTACTTTCT TCTTTCTTTT TGACTTAGGA 1140
 TATACAGATG ATAGGTCAAT GTGTCATTAA ACCCGCTGTT GTGCAACAAA AGGAAAAAAG 1200
 AAAAATACTC CTTTTAGGT CTTATAAATA TTTTATAGCAG CCATCAAATC CGGCTTTCAA 1260
 ACTTAATTTT ACCCTTTTTT ACGGCACCTT CGAGAATTAC ACTTTGGTTG CATGTAGGAG 1320
 TACGCGAAAT GCAGCAGAAG CTACACATCT ATGCGTAGAC CGCTTAACGT CTAAAGGCCG 1380
 TAACTTTTA TTTTGTTTG CGCTCATTA AACCTAGTGG GAGCTGGTAG GAAATAAGCT 1440
 AGTAGCTTCT ATGGATAGAA TGGAATAAAA CGTAGGTGTA AACACTATTG GTAGAGAAGT 1500
 TCCTCTGGTC AAATTTTCAT GGGAGATACG TTAAATCTTT CACAGTCTTA TCAAAATTTT 1560
 ATGGGAGATA CGTTAAATCT TTCACAGTCT TATCAAATTT TCATGGGAGA TACGTTAAAT 1620
 CTTTCACAGT CTTATCGTTT TGAATCACTG GACGGTCTG GTATTCTGCT TCATATTTTCG 1680
 ACAAATAAT AAATATAAAA AGAGCACCTT CATGATTCTT TGCTCTGCAG TAAATCCCG 1740
 AAATGATTTT CTTTAAATTG ATTAGACCA CTAACAAAAA 1779

【0031】

【発明の効果】本発明によれば、酵母を宿主とする異種遺伝子発現系において利用できる、高活性なプロモーターが提供される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 醸造用酵母中のLg-FLO1遺伝子転写産物量の経時変化を示す。

【図2】 lacZ遺伝子発現用プラスミドpYT-1

a c Zの構築図を示す。

【図3】 Lg-FLO1遺伝子5'上流の長さのプロモーター活性の関係を示す。

【図4】 醸造用酵母中のLg-FLO1プロモーターによるlacZ遺伝子発現量の経時変化を示す。

【図5】 Lg-FLO1プロモーターとGPDプロモーターによるlacZ遺伝子発現量の比較を示す。

【図1】

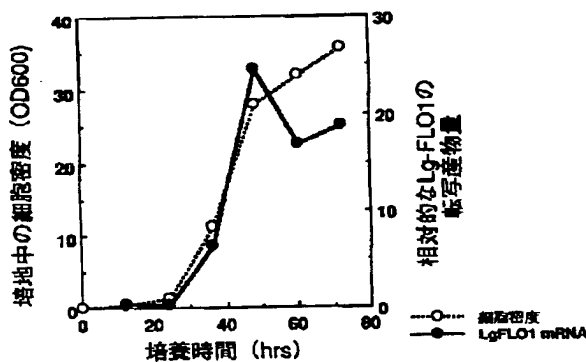


図1. 醸造用酵母中のLg-FLO1遺伝子の転写産物量の経時変化

【図3】

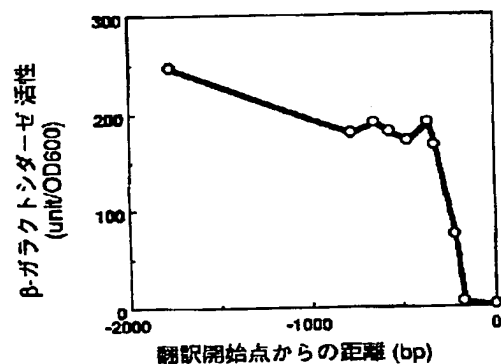


図3. Lg-FLO1遺伝子5'上流の長さのプロモーター活性の関係

【図2】

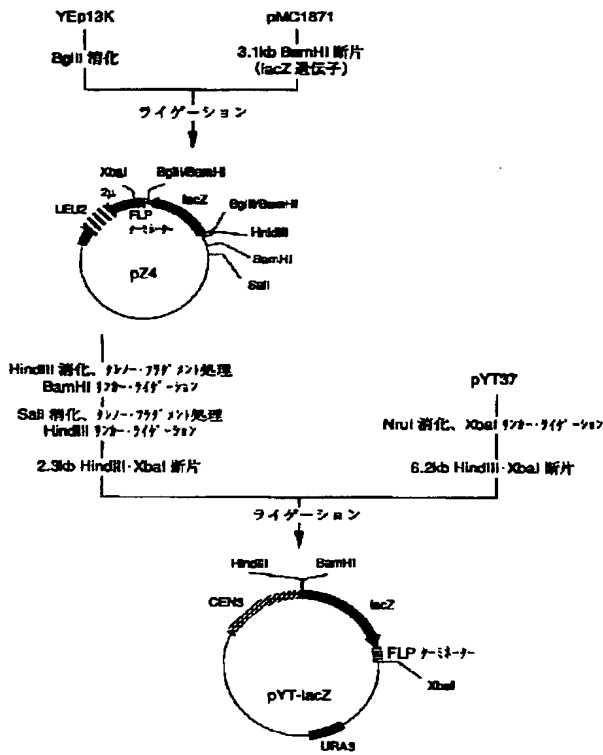


図2. lacZ遺伝子発現用プラスミド pYT-lacZの構築

【図5】

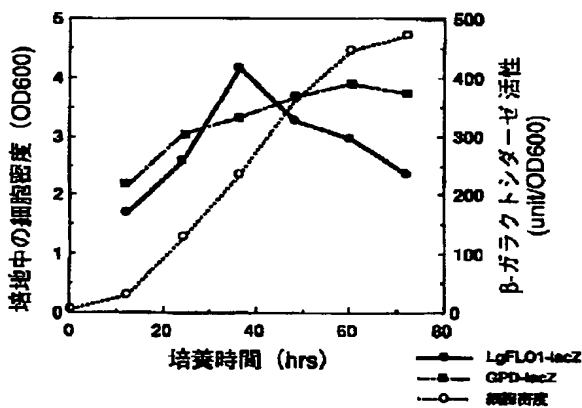


図5. Lg-FLO1プロモーターとGPDのプロモーターによるlacZ遺伝子発現量の比較

【図4】

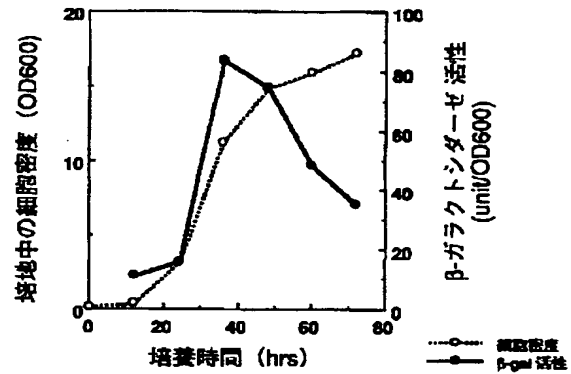


図4. 醸造用酵母中のLg-FLO1プロモーターによるlacZ遺伝子発現量の経時変化

フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 N 9/26

C 1 2 N 9/26

(C 1 2 N 1/19

C 1 2 R 1:865)

(C 1 2 N 9/04

C 1 2 R 1:865)

(C 1 2 N 9/10

C 1 2 R 1:865)

(C 1 2 N 9/26

C 1 2 R 1:865)